



УДК 593.14:57(08)

Д. А. Литвинюк, м. н. с., В. С. Муханов, канд. биол. наук, зав. лаб.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Национальной академии наук Украины, Севастополь, Украина

## УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОЛИ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ В МОРСКОМ ЗООПЛАНКТОНЕ

### ПОСЛЕ ОКРАСКИ НЕЙТРАЛЬНЫМ КРАСНЫМ И ДИАЦЕТАТОМ ФЛУОРЕСЦЕИНА

Степень окрашенности организмов зоопланктона витальными красителями может сильно варьировать, и, как следствие этого, слабо окрашенные особи трудно классифицировать как однозначно живые или мёртвые. Вывод исследователя о принадлежности организма со «спорной» окраской к той или иной категории может носить субъективный характер. В работе рассмотрен усовершенствованный способ идентификации живых/мёртвых организмов в окрашенных пробах мезозоопланктона путём оцифровки их изображений, осреднения цветовых (тоновых) и яркостных характеристик каждой из анализируемых особей и последующего дискриминантного анализа полученных данных для объективного и достоверного разделения всей исследуемой популяции на живых и мёртвых особей.

**Ключевые слова:** живой и мёртвый зоопланктон, смертность, окрашивание, оцифровка, нейтральный красный, диацетат флуоресцеина, дискриминантный анализ.

Известны два основных методологических подхода к проблеме идентификации живых и мёртвых организмов в сообществе зоопланктона: а) применяемый с 1930-х гг. по настоящее время визуальный анализ наличия или отсутствия у организма признаков разложения [1, 4, 5, 6, 9, 20, 21]; б) получивший развитие с 1970-х гг. метод маркирования живых или мёртвых особей с помощью специфических красителей [13, 16]. Преимущество первого подхода в том, что проба фиксируется сразу после отбора, т.е. этот подход легко совмещается с традиционными методами таксономического и количественного исследования зоопланктона. Однако он трудоёмок и предполагает наличие у исследователя определённых навыков оценки живого и мёртвого зоопланктона. Кроме того, признаки разложения визуально выявить можно лишь спустя 2 – 3 ч после гибели организма (иногда и позднее) [5, 6], что неминуемо приводит к недооценке доли мёртвых особей в пробе. Второй подход, основанный на применении витальных (прижизненных) и постмортальных (посмертных) красителей [10, 11, 14, 15, 19], несомненно, в большей степени отвечает современным требованиям благодаря его простоте и, одновременно, высокой специфичности и точности.

Независимо от того, какой краситель ис-

пользуется для маркирования живых/мёртвых организмов, основополагающим для их точной классификации является наличие или отсутствие цвета и/или яркости. Однако степень окрашенности организмов в пробах, взятых из моря (далее – пробы зоопланктона), может сильно варьировать, и, как следствие этого, слабо окрашенные особи трудно классифицировать как однозначно живые или мёртвые. Следовательно, вывод исследователя о принадлежности организма с «сомнительной» окраской к той или иной категории может носить *субъективный* характер. Если же численность таких организмов в пробе велика, достоверные и воспроизводимые результаты получить невозможно.

В экспериментах, проводимых нами ранее на модельной культуре солоноватоводной копеподы *Calanipeda aquaedulcis*, окрашенной диацетатом флуоресцеина (ДФ) и нейтральным красным (НК) [7], цветовая насыщенность живых особей была высокой, а организмы с невыраженной окраской практически отсутствовали. Применение этих же маркеров в полевом исследовании черноморского мезозоопланктона [8] было сопряжено с большими трудностями из-за значительной доли (до 50 %) особей с плохо выраженной, «сомнительной» окраской. Мы рассматриваем один из путей решения

этой проблемы и предлагаем усовершенствовать способ идентификации живых/мёртвых организмов в окрашенных пробах мезозoopланктона путём оцифровки их изображений, осреднения цветовых (тоновых) и яркостных характеристик каждой из анализируемых особей и последующего статистического анализа полученных данных для *объективно* и *достоверно* разделения всей исследуемой выборки на живых и мёртвых особей. Подобный подход может быть применён для решения широкого круга фундаментальных и прикладных задач, в которых требуется объективная классификация организмов (или иных объектов) по степени их окрашенности.

**Материал и методы.** Апробацию усовершенствованного метода проводили на пробах черноморского мезозoopланктона (все этапы – от сбора материала до статистического анализа данных) и модельной культуре *Calanipeda aquaedulcis* (от обработки микрофотографий до анализа данных). Цифровые изображения копепод *C. aquaedulcis*, полученные ранее в экспериментах с заведомо мёртвой/живой культурой (методика исследования и результаты представлены в [7]), использовали для измерения цветовых переменных отдельных особей и графического представления полученных данных.

Пробы зоопланктона отобраны в прибрежных водах на траверзе р. Бельбек (24.03.2010 г., 0 – 20 м, окраска НК) и бухте Южная (16.06.2010 г., 0 – 6 м, окраска ДФ). Пробы окрашивали на борту судна сразу после отбора и сохраняли в проточной забортной воде до прибытия в лабораторию. Организмы отмывали от красителей фильтратом (<0.3 мкм) морской воды, взятой одновременно с отбором проб. Интенсивность окраски измеряли только у копепод (копеподиты и половозрелые особи). Окраску проб с помощью НК проводили в соответствии с [16, 19]. Раствор ДФ готовили в диметилсульфоксиде (5 мг мл<sup>-1</sup>) и до использования хранили при +4°C. Пробы окрашивали ДФ (1 мкл раствора ДФ мл<sup>-1</sup>, 40 мин в темноте) в соответствии с [17].

Микрофотосъёмку организмов проводили под микроскопом Nikon Eclipse TS100-F, оборудованным камерой Ikegami ICD-848P, в световом (светлое и тёмное поле для НК) и люминесцентном режимах (набор светофильтров для возбуждения в синей области спектра для ДФ). Исследовано 173 калянипеды из культуры (науплии, копеподитные стадии и половозрелые особи) и 176 экз. массовых видов копепод (науплии не включены) – из проб

зоопланктона, и получены их фотографии в световом и люминесцентном режимах. В ходе анализа природных проб производилась визуальная оценка интенсивности окраски особей в поле зрения микроскопа (классический анализ с высокой степенью субъективности), в результате которой каждую особь относили к одному из двух классов – «живые» (L) или «мёртвые» (D). Если определить состояние организма по степени его окраски было затруднительно или невозможно, то его относили к третьему классу «сомнительные» (Q). В ходе фотосъёмки пробы мезозoopланктона, окрашенной ДФ, были изменены условия освещения в лаборатории (включены дополнительные лампы накаливания) для того, чтобы выяснить, как это отразится на результатах анализа.

Полученные цифровые изображения использовали для измерения цветовых/яркостных характеристик каждого из исследуемых организмов с помощью оригинального программного обеспечения ImageRegionColor v.1.3. под ОС MS Windows [2, 3]. Программа позволяет автоматически усреднять цвет выделенной области снимка, проводит измерения в соответствии с цветовыми моделями HSB (H – цветовой тон, S – насыщенность, B – яркость) и RGB (R – красный, G – зелёный, B – синий) и сводит полученные данные в таблицу, которая легко экспортируется в MS Excel. Переменная H (Hue) изменяется в диапазоне от 0 до 360° (непрерывный цветовой спектр), переменные S (Saturation) и B (Brightness) – от 0 до 100 %, переменные RGB – от 0 до 255.

Таким образом, для каждой анализируемой особи получали один набор значений из шести непрерывных переменных (HSB и RGB) и одной категориальной переменной (принадлежность к классам L, D или Q). На основе данных, полученных для репрезентативных выборок живых и мёртвых организмов, строили 2-параметрические диаграммы, комбинируя разные пары непрерывных переменных, выбирая те из них, которые эффективней всего позволяли разделять организмы на живые и мёртвые. Подобный подход применялся в экспериментах с культурой.

Анализ проб зоопланктона был затруднён присутствием слабо окрашенных организмов, поэтому для уменьшения размерности данных и правильной классификации организмов с «сомнительной» окраской (класс Q) применяли пошаговый дискриминантный анализ (Discriminant Function

Analysis в пакете StatSoft STATISTICA 6.0). Для построения дискриминантной модели использовали 6 независимых переменных (HSB и RGB) и одну группирующую зависимую переменную (с классами L и D в качестве обучающей выборки).

Дискриминантный анализ применяли также для того, чтобы выяснить, отличаются ли разные стадии развития *C. aquaedulcis* по своим цветовым характеристикам, иными словами – какие цветовые переменные и в какой степени позволяют различать возрастные категории N (науплии), C (копеподиты) и A (половозрелые особи) в культуре копепод.

**Результаты и обсуждение.** Результаты анализа цветовых характеристик копепод *C. aquaedulcis* в живой и заведомо мёртвой культурах после их окраски обоими красителями

представлены на рис. 1. На 2-параметрических графиках живые и мёртвые особи образуют хорошо различимые скопления точек (каждая из которых представляет отдельную особь). Обособленность кластеров живых (L) и мёртвых (D) организмов в пространстве цветовых переменных позволяла проводить их достоверную классификацию, причём процедура классификации не требовала применения дискриминантного анализа, поскольку в анализируемых выборках отсутствовали особи со спорной окраской. Подобный подход широко применяется в цитометрическом анализе, который, по своей сути, сводится к идентификации кластеров на 2-параметрических цитограммах.

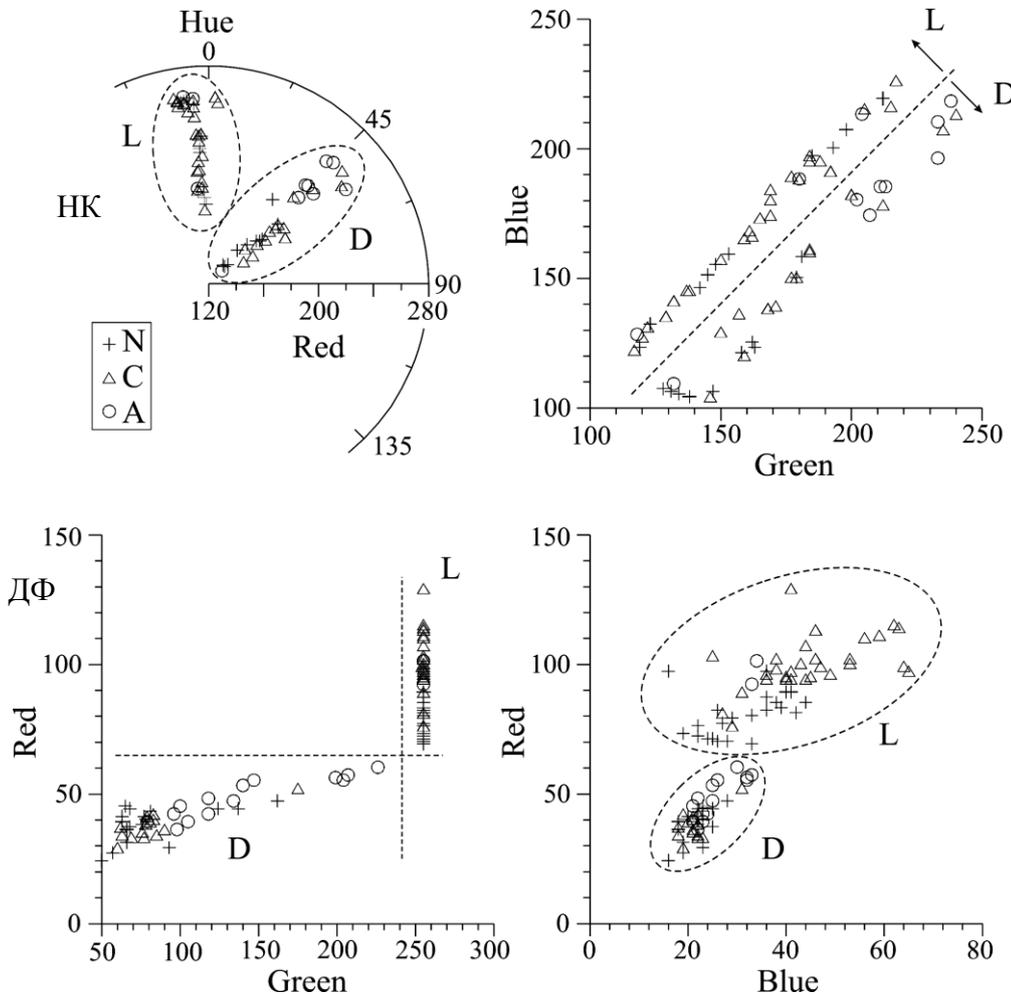


Рис. 1 Кластеры окрашенных НК (верхние графики) и ДФ (нижние графики) живых (L) и мёртвых (D) особей *C. aquaedulcis* на разных стадиях развития (N – науплии, C – копеподиты, A – половозрелые особи) в координатах цветовых компонент (Hue – цветовой оттенок, Red – красный, Green – зелёный, Blue – синий). Пунктирные линии обозначают условные границы кластеров

Fig. 1 Clusters of NR- (top graphs) and FDA-stained (bottom graphs) live (L) and dead (D) specimens of of different development stages (N – nauplii, C – copepodites, A – adults) in the space of the colour variables. Cluster borders are presented by dashed lines

Чтобы выяснить, отличаются ли разные стадии развития *C. aquaedulcis* (N – науплии, C – копеподитные стадии, A – взрослые особи)

по своим цветовым характеристикам, выполнен анализ канонических корреляций, определены последовательные канонические

корни и функции. Характер дискриминации для каждой дискриминантной (канонической) функции представлен на рис. 2. Во всех выборках корень 1 (root 1) в большей степени дискриминирует между группами, нежели корень 2 (root 2). В выборках живых организмов (левые графики) кластеры менее обособлены в пространстве, чем в выборках мёртвых. Это указывает на то, что разные возрастные стадии окрашенных копепод не отличались между собой по характеру окраски. Мёртвые неокрашенные организмы (правые графики), наоборот, постепенно меняли цветовую гамму в соответствии со стадией развития – кластеры

науплиев, копеподитов и взрослых особей образуют хорошо заметную последовательность в пространстве канонических функций (её направленность обозначена стрелками на рис. 2). Таким образом, окраска красителями уменьшала цветовые различия между стадиями развития *C. aquaedulcis*, что должно положительно сказываться на возможностях метода и качестве оценки долей живых/мёртвых особей в популяции копепод. Один и тот же методический подход может применяться к анализу смешанных проб, включающих разные стадии развития.

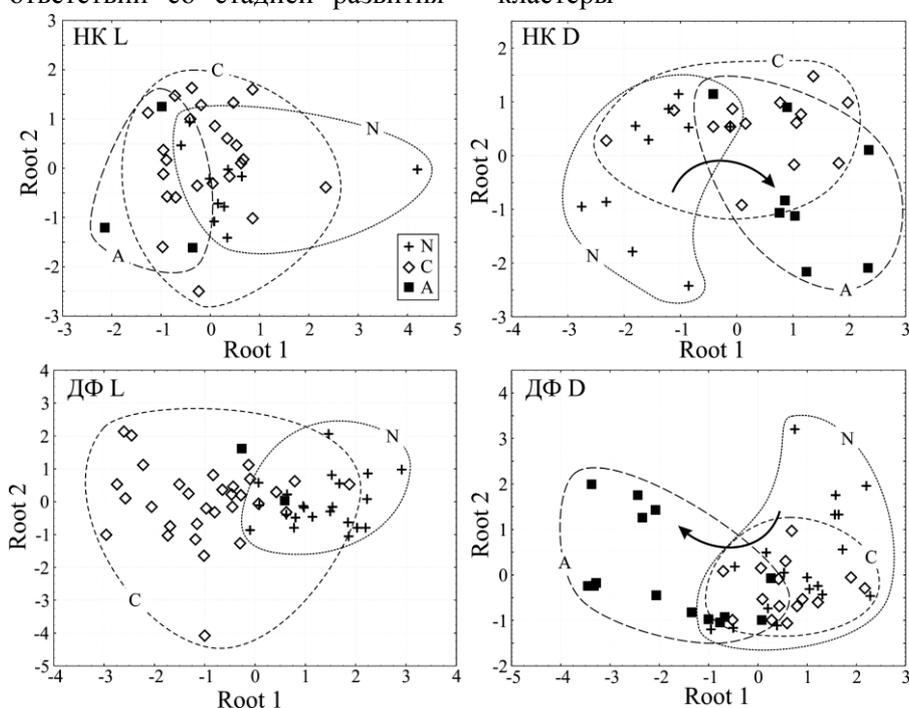


Рис. 2 Диаграмма рассеяния канонических значений для дискриминантных функций 1 и 2 окрашенных НК (верхние графики) и ДФ (нижние графики) живых (L) и мёртвых (D) особей *C. aquaedulcis* на разных стадиях развития (N – науплии, C – копеподиты, A – половозрелые особи) в координатах цветовых компонент (Hue – цветовой оттенок, Red – красный, Green – зелёный, Blue – синий)

Fig. 2 Scatterplots of the first two canonical discriminant functions derived from discriminant analysis of NR- (HK, top plots) and FDA-stained (ДФ, bottom plots) live (L) and dead (D) copepods *C. aquaedulcis* when using developmental stage (N – nauplii, C – copepodites, A – adults) as classification factor

Стандартизованные коэффициенты дискриминантных функций (табл. 1) характеризовали направление и вклад цветовых переменных в величину дискриминантных функций. Как видно из табл. 1, функция 1 отвечала за 95 – 97 % (ДФ) и 70 – 80% (НК) объясненной дисперсии и соответственно представляла наибольший интерес при проведении анализа. Стадии развития в выборке заведомо мёртвых (неокрашенных) организмов отличались, в первую очередь, по переменным Green, Brightness и Red, которые вносили наибольший вклад

в дискриминантную функцию 1. При окраске ДФ науплии отличались от копеподитных стадий более насыщенным зелёным цветом (переменные Green, Hue, Saturation функции 1), при окраске НК – более глубоким красным цветом (переменные Red, Brightness функции 1). Однако, как сказано выше, цветовые отличия между разными возрастными стадиями копепод после их окраски были незначительными и не могли повлиять на достоверность классификации всей выборки особей на живых и мёртвых.

В пробах зоопланктона недостаточное или неспецифическое окрашивание организмов затрудняло их классификацию. Доля особей со

спорной окраской (Q) достигала в пробах 1 и 2 соответственно 18 и 14 %.

Табл. 1 Стандартизованные коэффициенты дискриминантных функций (Кор. – корень, СЗ – собственное значение, КДОД – кумулятивная доля объясненной дисперсии)

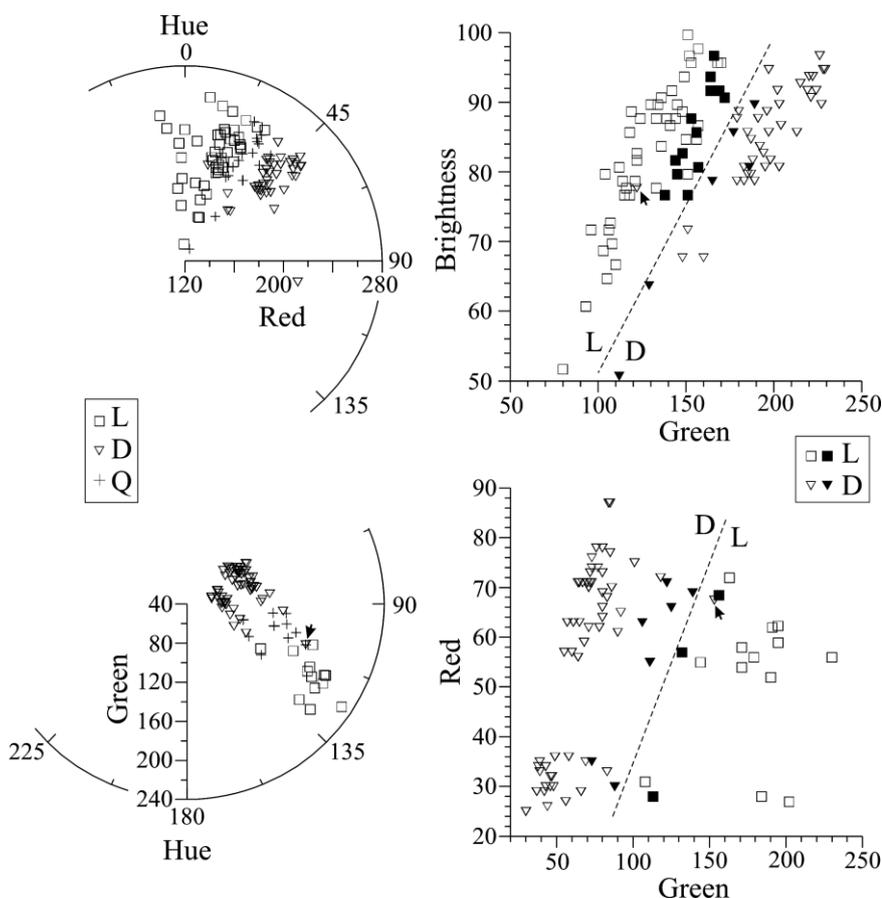
Table 1 Standardized canonical discriminant function coefficients (Кор. – function, СЗ – Eigenvalue, КДОД – cumulative percentage of variance, ДФ – FDA, НК – neutral red)

Переменная	ДФ, D		ДФ, L		НК, D		НК, L	
	Кор. 1	Кор. 2						
Hue	-2.07	-0.48	6.44	-4.89	1.23	-0.19	-0.58	0.21
Saturation	0.55	-1.60	4.50	7.44	-1.37	-0.66	-7.60	-3.83
Brightness	28.35	-15.53	1.94	36.81	4.44	-18.79	-10.56	25.07
Red	-3.20	0.12	2.45	-1.80	5.45	9.56	20.79	-18.56
Green	-27.69	17.69	-8.98	-36.63	-6.55	11.65	-8.00	-9.34
Blue	1.85	-0.63	2.03	8.15	-2.64	-3.25	-8.41	0.07
СЗ	1.50	0.07	1.26	0.03	1.13	0.25	0.19	0.07
КДОД	0.95	1.00	0.97	1.00	0.81	1.00	0.71	1.00

точек между кластерами L и D (рис. 3). Исследователь может провести условную границу между кластерами, как это делается в случае с

ском анализе эта процедура именуется гейтингом).

Рис. 3 Копеподы из окрашенных НК (верхние графики) и ДФ (нижние графики) проб морского зоопланктона, классифицированные по визуальным признакам как живые (L), мёртвые (D) и сомнительные (Q) в координатах цветовых компонент (Hue – цветовой оттенок, Red – красный, Green – зелёный, Brightness – яркость). Справа: результаты дискриминантного анализа – «сомнительные» особи отнесены к одному из классов – L или D (символы с чёрной заливкой). Стрелками показаны особи из обучающей выборки, которые, как показывает дискриминантный анализ, классифицированы исследователем ошибочно



динах цветовых компонент (Hue – цветовой оттенок, Red – красный, Green – зелёный, Brightness – яркость). Справа: результаты дискриминантного анализа – «сомнительные» особи отнесены к одному из классов – L или D (символы с чёрной заливкой). Стрелками показаны особи из обучающей выборки, которые, как показывает дискриминантный анализ, классифицированы исследователем ошибочно

Fig. 3 NR- (top plots) and FDA-stained (bottom plots) natural copepods classified visually to live (L), dead (D) and questionable (Q) in the space of the colour variables. Right plots represent the results of discriminant analysis: Q-specimens have been classified to L or D (black symbols)

В этом случае качество классификации организмов будет выше, чем при традиционном визуальном анализе под микроскопом, однако сохранится некоторая степень субъективности в выборе положения условной границы. Дискриминантный анализ цветовых переменных позволил выявить переменные, обладающие наибольшими дискриминантными способ-

ностями в определении живых/мёртвых копецод (табл. 2). По величинам лямбды Уилкса и F-значениям можно сделать вывод, что предложенная классификация корректна ( $p < 0.0001$ ). Редукция количества используемых независимых переменных не привела к снижению качества и значимости классификации.

Табл. 2 Модель классификации организмов морского зоопланктона на живые и мертвые по цветовым характеристикам. Приведены переменные, значение которых в классификационной модели велико (уровень значимости  $p < 0.05$ )

Table 2 Model for classifying marine zooplankton to live and dead fractions by their colour variables and discriminant analysis. Variables are included at  $p < 0.05$

Переменная	Лямбда Уилкса $\lambda$	Частная лямбда	F-значение	$p$	Толерантность
Проба зоопланктона 1, окраска НК; Лямбда Уилкса $\lambda = 0.129$ ; $F(4, 78) = 131.6$ ; $p < 0.0000$					
Hue	0.145	0.893	9.38	0.0030	0.8277
Brightness	0.136	0.949	4.22	0.0433	0.0008
Green	0.258	0.500	78.13	0.0000	0.2783
Результаты классификации выборки Q ( $n = 19$ ): апостериорные вероятности $0.927 \pm 0.147$ (ст. откл.)					
Проба зоопланктона 2, окраска ДФ; Лямбда Уилкса $\lambda = 0.137$ ; $F(4, 66) = 104.0$ ; $p < 0.0000$					
Hue	0.146	0.939	4.25	0.0431	0.2399
Red	0.159	0.861	10.62	0.0018	0.1387
Green	0.170	0.806	15.92	0.0002	0.0408
Результаты классификации выборки Q ( $n = 10$ ): апостериорные вероятности $0.933 \pm 0.128$ (ст. откл.)					

Значение частной лямбды характеризует единичный вклад соответствующей переменной в разделительную силу модели – чем меньше статистика, тем больше вклад переменной в общую дискриминацию. Из табл. 2 видно, что при окраске НК (проба 1) наибольший вклад в общую дискриминацию вносят переменные Green и Hue, при окраске ДФ (проба 2) – переменные Green и Red. Можно было бы ожидать, что характер окраски организмов НК будет определяться исключительно красной цветовой компонентой, а ДФ – зелёной. Однако в соответствии с результатами анализа, другие цветовые характеристики обладают не меньшей (а иногда и большей) дискриминационной способностью. В случае с НК, например, это связано с тем, что как живые (красный цвет), так и мёртвые (бурый цвет) особи имеют высокий уровень красного цвета, а различаются по своему цветовому тону (Hue), который формируется благодаря вкладу других цветов, в первую очередь, зелёного (Green).

Живые организмы, окрашенные ДФ, имеют ярко зелёную флуоресценцию (много зелёного, мало других цветов) в отличие от мёртвых особей со слабым свечением (мало зелёного) и бурый оттенком (присутствие красного).

Характер и уровень внешнего освещения в лаборатории может существенно влиять на цвет организмов и, следовательно, на дискриминационную способность разных цветовых переменных. Добавление искусственного освещения в ходе анализа пробы 2 (окраска ДФ) приводило к смещению кластеров вдоль красной цветовой компоненты Red (рис. 3, график справа внизу) – на графике каждый из кластеров, L и D, имеет верхнюю и нижнюю «секции», которые соответствуют разным режимам освещения. Это не отразилось на результатах классификации организмов на живые и мёртвые в данной пробе (как графическими, так и статистическими методами), но, несомненно, может приводить к трудностям в анализе данных.

Дискриминационная модель, полученная на основе обучающих выборок L и D, позволила классифицировать выборку Q, отнеся каждую из составляющих её особей к одному из классов – L или D, в соответствии с апостериорными вероятностями. В среднем, величины апостериорных вероятностей в обеих пробах составили около 93 % (табл. 2), что указывает на высокое качество проведённой классификации (рис. 3).

Таким образом, новый подход, основанный на измерении цветовых переменных отдельных особей и последующем дискриминантном анализе данных, позволяет оценить статистическую достоверность самих результатов определения долей живых и мертвых особей в пробе, избежать какой-либо субъективности в измерениях. Новый метод успешно применён в исследовании сезонной динамики доли живых *Soropoda* в планктоне Севастопольской бухты [7].

Микрофотосъёмка. Съёмку окрашенных организмов следует проводить на цифровую фотокамеру в цветном режиме. Автоматический режим камеры не рекомендуется использовать по следующей причине. Если в поле зрения попадают только яркие (например, живые организмы, окрашенные ДФ) или только тёмные объекты (близкие по яркости к тёмному фону мёртвые организмы), то проводимая фотокамерой автокоррекция изображений будет искажать цветовые и яркостные характеристики объектов, и, как следствие, сопоставление таких изображений будет невозможным. Рекомендуется выбрать настройки фотокамеры в ручном режиме таким образом, чтобы избежать, во-первых, пересветов на наиболее ярких объектах (т.е. потери информации о яркости и цвете) и, во-вторых, сливания объектов с фоном (например, неокрашенные объекты на тёмном поле люминесцентного микроскопа), и сохранять эти настройки неизменными в течение фотосъёмки всей пробы. Это гарантия того, что изображения и живых, и мёртвых организмов одной и той же пробы получены при одина-

ковых условиях и, следовательно, могут быть успешно использованы в дальнейшем анализе. Уровень и характер освещения в лаборатории также следует сохранять постоянными на протяжении съёмки всей пробы, поскольку его изменение приводит к смещению кластеров на графиках и может затруднить анализ данных.

Индивидуальные особенности фотокамер не могут отразиться на качестве получаемых результатов. Это означает, что анализ одной и той же пробы зоопланктона, проведённый на разном оборудовании, но в соответствии с описанным здесь методом, даст одинаковые результаты по соотношению живых и мёртвых организмов в пробе.

Серии фотоснимков организмов, полученные для данной пробы, представляют собой источник информации для дальнейшего анализа, поэтому они не должны быть изменены при редактировании, перезаписи файлов и других операциях. Такие свойства как яркость, контраст, насыщенность, цветовой баланс и др. должны оставаться в оригинальных изображениях без изменений.

Измерение цветовых/яркостных характеристик организмов. В качестве программного обеспечения для дальнейшей работы с изображениями подходит любой редактор растровой графики, позволяющий определять основные цветовые и яркостные характеристики любого из пикселей изображения в соответствии с цветовыми моделями HSB и RGB и осреднять их значения в выбранной пользователем области изображения. Для этих целей можно использовать, например, программный пакет Adobe Photoshop. Однако программа ImageRegionColor (IRC) обеспечивает максимальную эффективность и качество обработки проб, поскольку написана специально для целей и задач приводимого в данной работе анализа.

Для каждой анализируемой особи получают один набор значений упомянутых выше характеристик, поэтому важны локализация и способ отбора пробы цвета в пределах границ

изображения организма. Отбор должен проводиться в зонах наибольшей интенсивностью окраски (у окрашенных ДФ или НК копепод это – цефалоторакс). У неокрашенных организмов используется та же зона. Если изображение интересующей области неоднородно по цвету и яркости, необходимо выделять всю окрашенную область (инструмент «лассо», Lasso Tool, в Adobe Photoshop) и осреднять её яркостные и цветовые характеристики, и только потом проводить измерение (как это и делалось в данной работе). Важно, чтобы процедура осреднения была унифицирована для анализа всей пробы. В Adobe Photoshop она может быть выполнена с помощью фильтра «Среднее размытие» (меню Filter > Blur > Average), а измерение цветовых характеристик проведено с помощью инструмента «Пипетка» (Eyedropper Tool). В программе IRC необходимо вручную выделять нужную область, а остальные процедуры проводят автоматически.

Алгоритм обработки пробы. Этап I. Отбор пробы мезозоопланктона и её окраска для идентификации живых/мёртвых организмов. Этап II. Исследование репрезентативной выборки организмов под микроскопом для: а) сортировки особей по классам «Живые» (L), «Мёртвые» (D), «Сомнительные» (Q) по визуальным признакам (интенсивности окраски); б) получение цифровых изображений каждой особи. Этап III. Измерение средних для каждой особи цветовых и яркостных характеристик (цветовые модели HSB, RGB) в графическом редакторе. Этап IV. Сведение полученных данных в таблицу в формате, пригодном для дискриминантного анализа. Этап V. Применение дискриминантного анализа для: а) уменьшения размерности данных (пошаговый анализ с включением переменных); б) построения классификации объектов, используя классы L и D в качестве обучающей выборки; в) выделения в соответствии с дискриминантной моделью классов L или D среди организмов класса Q.

Применение метода в исследованиях других гидробионтов. Одним из преимуществ

описанного подхода является его универсальность как в смысле выбора объектов исследования, так и целей их классификации. Он может быть применён для анализа фотоизображений не только зоопланктона, но и любых других окрашенных организмов, будь то икра рыб, личинки полихет или микробные плёнки. Выбор красителя не накладывает каких-либо ограничений на процедуру обработки изображений, поскольку во всех случаях для классификации объектов используется один и тот же критерий – степень и характер их окраски. Более того, если цели окраски организмов сводятся не столько к их классификации на живые и мёртвые, а, например, к объективизации описания окраски любого объекта, то это существенно расширяет область применения метода.

Затраты времени на обработку пробы зоопланктона в соответствии с предлагаемым методом достаточно велики (2 – 3 ч) и сопоставимы с таковыми при проведении классического визуального анализа проб. Однако увеличение качества получаемых результатов – не единственное оправдание подобных затрат. В перспективе метод может быть эффективно использован в автоматических анализаторах нового поколения, таких, например, как портативный проточный цитометр FlowCAM (Fluid Imaging Technologies, Inc., США) с модулем визуализации объектов, как в световом, так и флуоресцентном режимах [12, 18]. Кроме стандартных для цитометра функций, система FlowCAM обеспечивает автоматическое распознавание образа каждого из объектов и сохранение его цифрового изображения. Визуализация объектов позволяет исследователю уточнить таксономическую принадлежность присутствующих в пробе организмов. Время, затрачиваемое на анализ одной пробы зоопланктона (с классификацией организмов на живые и мёртвые), может быть сокращено на порядок при её полуавтоматической обработке, которая, в свою очередь, возможна при включении соответствующих программных модулей в программное обеспечение FlowCAM.

1. Губарева Е. С., Светличный Л. С., Ишинбиллир М. Распределение живого и мёртвого мезозoopланктона в прибосфорских районах Чёрного и Мраморного морей: солёностная толерантность *Acartia clausi* и *A. tonsa* // Морск. экол. журн. – 2008. – 7, № 4. – С. 27 – 39.
2. Дзицкий В. С. Компьютерная программа ImageRegionColor // Свидетельство про регистрацию авторского права на произведение №36639 от 21.01.2011.
3. Дзицкий В. С. Компьютерная программа для оценки цветовых характеристик окрашенных зоопланктонных организмов // Понт Эвксинский: Тез. докл. VII Межд. науч.-прак. конф. мол. уч. (Севастополь 24 – 27 мая 2011 г.). – Севастополь, 2011. – С. 98 – 99.
4. Зелезинская Л. М. Естественная смертность некоторых форм ихтио- и зоопланктона Чёрного моря: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Одесса, 1966. – 20 с.
5. Кастальская-Карзинкина М. А. Методика определения живых и отмерших компонентов планктона на фиксированном материале // Тр. лимнолог. ст. в Косине. – 1935. – № 19. – С. 91 – 103.
6. Коваль Л. Г. Зоо- и некрозоопланктон Чёрного моря. – К.: Наук. думка. 1984. – 128 с.
7. Литвинюк Д. А., Аганесова Л. О., Муханов В. С. Определение доли живых организмов в культуре копеподы *Calanipeda aquaedulcis* после их окраски нейтральным красным и диацетатом флуоресцеина // Экология моря. – 2009. – Вып. 78. – С. 65 – 69.
8. Литвинюк Д. А., Алтухов Д. А., Муханов В. С. Динамика доли живых Сорерода в планктоне Севастопольской бухты и открытого побережья в 2010 – 2011 гг. // Морск. экол. журн. – 2011. – Отд. вып. №2. – С. 56 – 65.
9. Павлова Е. В., Мельникова Е. Б. Зоопланктон прибрежных вод юго-западного Крыма (1998 – 2006 гг.) // Морск. экол. журн. – 2011. – 10, № 3. – С. 33 – 41.
10. Семёнова А. С. Индикаторная роль зоопланктона в оценке экологического состояния Куршского залива: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Борок, 2010. – 20 с.
11. Bickel S. L., Tang K. W., Grossart H. P. Use of aniline blue to distinguish live and dead crustacean zooplankton composition in freshwaters // Freshwater Biology. – 2008. – 54, № 5. – P. 971 – 981.
12. Culverhouse P. F., Williams R., Benfield M. Automatic image analysis of plankton: future perspectives // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 2006. – 312. – P. 297 – 309.
13. Dressel D. M., Heinle D. R., Grote M. C. Vital starting to sort dead and live copepods // Chesapeake Sci. – 1972. – 13. – P. 156 – 159.
14. Dubovskaya O. P. Evaluation of Possible Causes of Non-Predatory Mortality of Crustacean Zooplankton in a Small Siberian Reservoir // J. Siberian Fed. Univ. Biol. – 2008. – 1. – P. 145 – 161.
15. Elliott D. T., Tang K. W. Influence of carcass abundance on estimates of mortality and assessment of population dynamics in *Acartia tonsa* // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 2011. – 427. – P. 1 – 12.
16. Fleming J. M., Coughlan J. Preservation of vitally stained zooplankton for live/dead sorting // Estuaries. – 1978. – 1. – P. 135 – 137.
17. Onji M., Sawabe T., Ezura Y. An evaluation of viable dyes suitable for marine phytoplankton // Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. – 2000. – 51, 3. – P. 153 – 157.
18. Sieracki C. K., Sieracki M. E., Yentsch C. S. An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1998. – 168. – P. 285 – 296.
19. Tang K. W., Freund C. S., Schweitzer Ch. L. Occurrence of copepod carcasses in the lower Chesapeake Bay and their decomposition by ambient microbes // Estuar. Coast. Shelf Sci. – 2006. – 68. – P. 499 – 508.
20. Weikert H. Copepod carcasses in the upwelling region south of Cap Blanc, N.W. Africa // Marine Biology. – 1977. – 42. – P. 351 – 355.
21. Wheeler E. H. Copepod detritus in the deep sea // Limnol. Oceanogr. – 1967. – 12. – P. 697 – 702.

Поступила 08 февраля 2012 г.  
После доработки 26 июня 2012 г.

**Удосконалений метод визначення долі живих організмів у морському зоопланктоні після фарбування нейтральним червоним і діацетатом флуоресцеїна.** Д. А. Літвінюк, В. С. Муханов. У природних пробах зоопланктону ступінь забарвленості організмів вітальними барвниками може сильно варіювати, і, як наслідок цього, слабо забарвлені особини важко класифікувати як однозначно живі чи мертві. Якщо ж частка таких організмів в пробі велика, достовірні і відтворювані результати отримати неможливо. У даній роботі розглядається один із шляхів вирішення цієї проблеми - удосконалений спосіб ідентифікації живих/мертвих організмів в забарвлених пробах мезозoopланктона шляхом оцифрування їх зображень, осереднення колірних (тонових) і яскравості характеристик кожної з аналізованих особин і подальшого дискримінантного аналізу отриманих даних для об'єктивного і достовірного поділу всій досліджуваній популяції на живих і мертвих особин.

**Ключові слова:** живий та мертвий зоопланктон, смертність, забарвлення, оцифровка, нейтральний червоний, діацетат флуоресцеїну, дискримінантний аналіз

**Advanced method for identifying alive organisms in marine zooplankton stained with neutral red and fluorescein diacetate. D. A. Lytvynuk, V. S. Mukhanov.** In natural zooplankton samples, the intensity of staining specimens with vital dyes varies significantly and, as a result, it is difficult to classify poorly stained organisms exactly to either alive or dead. If the fraction of the ‘questionable’ organisms in the sample is high, it is impossible to obtain reliable and reproducible results. In this work, a solution of the problem is considered, which is an advanced approach for identifying live/dead organisms in stained samples of mesozooplankton through digitizing their images, averaging their colour (hue) and brightness and, finally, applying discriminant analysis of the colour data obtained for every specimen to classify the latter as live or dead.

**Keywords:** live and dead zooplankton, mortality, staining, digitizing, neutral red, fluorescein diacetate, discriminant analysis

### ЗАМЕТКА

**Аномальное цветение *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) в Чёрном море в 2012 г. [Аномальне цвітіння *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) у Чорному морі у 2012 р. Abnormal blooming by *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) in the Black Sea in 2012].** В 2012 г. в Чёрном море наблюдали интенсивное цветение воды, вызванное массовым развитием нанопланктонного вида кокколитофорид *Emiliana huxleyi* (Lohmann) W.W. Hay & H.P. Mohler. Покрытые кальцитовыми пластинами клетки *E. huxleyi* существенно увеличивают рассеяние света в оптическом диапазоне, что позволяет по величине сигнала сканеров MODIS и SeaWiFS выделить зоны цветения по яркости восходящего излучения (Balch, 2005). Оперативные наблюдения за оптическими свойствами поверхностного слоя Чёрного моря (dvs.net.ua/mp), проводимые в МГИ НАНУ, и регулярные исследования фитопланктона, выполняемые сотрудниками ЮНЦ РАН в северо-восточной части Чёрного моря, позволили детектировать аномальное по интенсивности и продолжительности (май – июль) цветение кокколитофориды *E. huxleyi* в 2012 г.: такой продолжительности и интенсивности цветения кокколитофорид в Чёрном море в «спутниковую эру» (15 лет) ещё не наблюдали. Цветение возникло в глубоководной восточной части моря в начале второй декады мая и в течение недели распространилось на всю акваторию восточнее 35°E, а к 27 мая уже охватило всю глубоководную (за исключением СЗ шельфа) часть моря. Максимум интенсивности цветения приходился на июнь, ослабление этого явления отмечали в третьей декаде июля, причём отдельные зоны цветения в западной и восточной частях моря наблюдали также в первой декаде августа. Исследования, проведённые в этот период сотрудниками ЮНЦ РАН в северо-восточной части моря, показали, что цвет воды в море имел молочно-белый оттенок, прозрачность не превышала 2 м (в обычное время прозрачность воды в открытом районе моря достигала 10 – 15 м). При этом численность кокколитофорид на открытом шельфе в районе Новороссийска (до 16 млн. кл. л<sup>-1</sup>) была на порядок выше, чем в прошлые годы. В последние годы спутниковые наблюдения фиксировали квазидвухлетнюю периодичность развития *E. huxleyi* во всем Чёрном море, что подтверждается натурными исследованиями (Паутова и др., 2007; Суханова, 1995; Burenkov et al., 2006; Sokasag et al., 2001; Mikaelyan et al., 2006). Одной из возможных причин интенсификации развития кокколитофорид является глубокая зимняя конвекция. Так, холодные зимы 1998, 1999, 2006 и 2008 гг. способствовали более интенсивному и продолжительному цветению фитопланктона, чем в предыдущие и в последующие годы (Незлин, 2001; Паутова и др., 2007, Станичный, 2012). Зима 2012 г. характеризовалась низкими температурами и интенсивным ветровым перемешиванием. По данным ARGO дрейфтеров (<http://www.argodatamgt.org/Access-to-data/Argo-data-selection>), глубина верхнего перемешанного слоя достигала в феврале 100 – 150 м, а температура в глубоководной части моря – 6.3°C, что могло вызвать поступление большого количества биогенов в верхние слои моря. Участвовавшие случаи цветения воды кокколитофоридами в различных районах Мирового океана зачастую охватывают сотни тысяч квадратных километров морской поверхности и напрямую связаны с проблемой обмена углекислым газом между атмосферой и океаном (Engel et al., 2005; Riebesell, 2004). В связи со способностью кокколитофорид регулировать уровень CO<sub>2</sub> в атмосфере и, как следствие, влиять на температурный режим и климатические условия нашей планеты, исследования динамики развития *E. huxleyi* в современный период приобретают особую значимость. **О. Н. Ясакова**, н. с. (Институт аридных зон ЮНЦ РАН, Ростов-на-Дону, Россия), **С. В. Станичный**, д. ф-м. н., вед. н. с. (Морской гидрофизический институт, НАН Украины, Севастополь, Украина).